

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FRAMBOESA (*RUBUS IDAEUS* L.). CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA ALEGAÇÃO DE SAÚDE

Madalena Bettencourt da Câmara

Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz, CiiEM, Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior CRL, Caparica, Portugal, mbcamara@gmail.com

João Pedro Borges Ferreira

Pharmacology and Translational Research Group, iMED – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal

Ana Varela Coelho

Instituto de Tecnologia Química e Biológica, ITQB, Portugal

Rui Feliciano

Grupo de investigação Reed, Universidade de Wisconsin-Madison, EUA

Andreia Bento da Silva

Instituto de Biológica Experimental e Tecnológica, IBET, Portugal

Elsa Mecha

Instituto de Biológica Experimental e Tecnológica, IBET, Portugal

Maria do Rosário Bronze

Pharmacology and Translational Research Group, iMED – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal

Rosa Direito

Pharmacology and Translational Research Group, iMED – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal

Bruno Sepodes

Pharmacology and Translational Research Group, iMED – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal

Maria Eduardo Figueira

Pharmacology and Translational Research Group, iMED – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal

RESUMO: As framboesas são uma fonte dietética de fibras, vitaminas, minerais e de compostos bioativos não-nutrientes, sobretudo compostos fenólicos. Os fitoquímicos destes frutos, sobretudo antocianinas e elagitaninos, têm demonstrado atividades biológicas, antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiproliferativa e anticancerígena, entre outras. No entanto, na sua maioria os trabalhos publicados são estudos *in vitro* pelo que não existem alegações de saúde autorizadas para estes não-nutrientes da framboesa. Assim, visando dar um contributo para o desenvolvimento de uma alegação de saúde para estes fitoquímicos, procedeu-se à: ⁽¹⁾caracterização da composição fenólica de um extrato de uma amostra de framboesas colhidas em 2010 e avaliação da atividade biológica (capacidade antioxidante e anti-inflamatórias) *in vitro* e *in vivo* em modelos celulares e animais; ⁽²⁾caracterização química de amostras de genótipos distintos de *Rubus idaeus* L., produzidos na região de Odemira entre 2011 e 2013; ⁽³⁾realização de um estudo de intervenção nutricional em humanos (ENIH),

com o objetivo de estudar o efeito do consumo de 150 g de framboesas do genótipo selecionado, diariamente, durante 3 semanas, no stresse pós-prandial metabólico, oxidativo e inflamatório, induzido por uma refeição hipercalórica rica em gordura e açúcar (RRGA), em voluntários saudáveis. Os resultados obtidos foram analisados e discutidos tendo em conta os requisitos legais vigentes e orientações da Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos respeitantes à fundamentação científica de alegações de saúde na UE.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos fenólicos, antocianinas, elagitaninos, atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória

CHEMICAL AND BIOLOGICAL EVALUATION OF RASPBERRY (*RUBUS IDAEUS* L.). CONTRIBUTION TO THE DEVELOPMENT OF A HEALTH CLAIM

ABSTRACT: Raspberries are a source of dietary fiber, vitamins, minerals and nutrients non-bioactive compounds, mainly phenolic compounds. The phytochemicals of these fruits, especially ellagitannins and anthocyanins, have shown biological activities, antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer and antiproliferative, among others. However, most of the published works are *in vitro* studies so there is no authorized health claims for these raspberry non-nutrients. Thus, aiming to contribute to the development of an health claim for these phytochemicals we proceeded to the: ⁽¹⁾characterization of the phenolic composition of an raspberry extract from a sample harvested in 2010 and evaluation of the biological activity (antioxidant capacity and anti-inflammatory) *in vitro* and *in vivo*, in cellular and animal models; ⁽²⁾chemical characterization of samples of different genotypes of *Rubus idaeus* L. produced in Odemira region between 2011 and 2013; ⁽³⁾realization of a nutritional intervention essay in humans (ENIH), in order to study the effect of consumption of 150 g raspberries (selected genotype) daily for 3 weeks, the metabolic, oxidative and inflammatory postprandial stress induced by a high calorie meal rich in fat and sugar (RRGA) in healthy volunteers. The results were analyzed and discussed taking into account the legal requirements and guidelines of the European Food Safety Authority concerning the scientific basis of health claims in the EU.

KEYWORDS: Phenolic compounds, anthocyanins, ellagitannins, antioxidant activity, anti-inflammatory activity

1 | INTRODUÇÃO

As doenças crónicas, atualmente a principal causa de morte em todo o mundo, têm aumentado dramaticamente consequência das modificações de estilos de vida, nomeadamente sedentarismo, níveis elevados de stresse e alterações na dieta. Segundo a OMS estas mortes prematuras podem ser prevenidas¹. Processos inflamatórios não infecciosos têm sido implicados na etiologia dessas patologias². A promoção de hábitos alimentares saudáveis, tais como o aumento da ingestão de

frutas e produtos hortícolas, a principal fonte de (poli)fenóis bioativos, constitui uma via para a proteção da saúde das populações^{1,3}. A framboesa (*Rubus idaeus* L.) é um fruto que apresenta diversos macro e micronutrientes com interesse farmacêutico, nomeadamente fibra, ácido ascórbico e não-nutrientes como compostos fenólicos⁴. A composição fenólica da framboesa é dominada por antocianinas e elagitaninos e inclui em menor quantidade glicósidos de ácido elágico e conjugados de flavonóis^{5,6}. Na última década, estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que os compostos fenólicos da framboesa vermelha apresentam uma gama alargada de atividades biológicas: antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa e anticancerígena, antimicrobiana e respeitantes a obesidade e à gestão do teor de glucose no sangue, entre outras⁷. Os estudos científicos que fundamentam as alegações de saúde devem consistir principalmente em estudos no ser humano, intervencionais e/ou observacionais⁸. Embora alguns estudos tenham começado a desvendar os efeitos anti-inflamatórios de extratos de framboesa vermelha *in vitro* e *in vivo*, estes são na sua maioria estudos preliminares que requerem uma maior elaboração de modo que uma abordagem translacional para a prática clínica é uma meta realista a considerar uma terapia adjuvante⁹. A investigação que se descreve teve por objetivo a caracterização química e biológica de frutos de *Rubus idaeus* L. produzidos em território nacional visando dar um contributo para o desenvolvimento de uma alegação de saúde. Os objetivos específicos do trabalho experimental foram os seguintes: caracterização da composição fenólica de amostras de variedades de *Rubus idaeus* L. com expressão em território nacional ao longo de um ciclo produtivo e ao longo de 3 anos consecutivos; seleção de uma variedade de framboesa com base no estudo da composição fenólica de cultivares de *Rubus idaeus* L. com expressão em território nacional; avaliação *in vitro* de atividades antioxidantes e anti-inflamatórias de um extrato de framboesa; e avaliação *in vivo*, em modelos animais e em humanos, de atividades antioxidantes e anti-inflamatórias de extratos de framboesa e de framboesas.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e Padrões

A água usada na preparação de reagentes e soluções era água desionizada (tipo I), obtida num sistema de purificação de água ultrapura Milli-Q® Reference/Millipore Direct Q3 UV System (Millipore, Bedford, US) com uma condutividade $\leq 0,058 \mu\text{S}$. Os reagentes usados apresentavam grau analítico ou HPLC. O ácido gálico (98%), ácido sulfúrico (95-97%) e o luminol foram adquiridos na Fluka (Seelze, Alemanha). O hidróxido de sódio (98%), cloreto de cálcio di-hidratado, sulfato de magnésio e o hidrogenocarbonato de sódio foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido clorídrico (0,1 M), etanol absoluto (99,9%), metanol (99,9%), ácido acético glacial (99%) e acetato de sódio anidro (99%) foram adquiridos à Carlo Erba Reagentes (Rodano, Itália). A cianidina-3-O-glucósido foi adquirida à

Extrasynthese (Lyon Nord, França). O ácido tânico foi comprado ao laboratório BDH (Poole, Inglaterra). ácido fosfórico p.a. (85%) e ácido ascórbico foram adquiridos à Panreac Química (Barcelona, Espanha). Acetonitrilo de grau HPLC foi adquirido à VWR® (Leuven, Bélgica). O cloreto de potássio foi obtido na Pronalab (Abrunheira, Portugal). Cloreto de sódio e sal de sódio de 2,6-diclorofenol indophenols (90%) foram comprados na Riedel-de Haën (Hannover, Alemanha). Todos os restantes reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). *kits* de ensaios imunoenzimáticos ELISA de fase sólida de alta sensibilidade Quantikine® da R&D Systems Inc. (Minneapolis, US), para o doseamento em humanos das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. *kits* de ensaios imunoenzimáticos ELISA de fase sólida da Mercodia® (Uppsala, SE), para o doseamento em humanos da LDL oxidase (LDLox); *kits* comerciais Cobas c pack da Roche para a determinação dos parâmetros bioquímicos glucose, triglicéridos, colesterol total, HDL e LDL da Roche (Roche Portugal, Amadora, PT).

Amostras

Os frutos de *Rubus idaeus* L. utilizados neste trabalho eram frutos sãos, inteiros e maduros, produzidos no Alentejo Litoral, na região de Odemira entre 2010 e 2013, sobretudo na Herdade Experimental da Fataca⁷. Himbo-top, Amira, Erika e Polka foram as cultivares consideradas na seleção da cultivar-alvo do estudo de intervenção nutricional em humanos.

Preparação dos extratos de framboesa

Foram produzidos dois extratos de framboesa ricos em compostos fenólicos, segundo adaptação dos procedimentos descritos por Mullen *et al.*⁵ e González-Barrio *et al.*¹⁰ apresentado em Correia⁷.

Métodos

Caracterização química: os teores em vitamina C, fenóis totais, flavonóides totais, antocianinas totais, taninos condensados totais e taninos hidrolisados totais foram realizados pelos métodos espectrofotométricos descritos em Figueira *et al.*⁹; a análise individual dos compostos fenólicos foi efetuada pelos métodos cromatográficos e de espectrometria de massa descritos igualmente em Figueira *et al.*⁹.

Avaliação da atividade biológica do extrato de framboesa *in vitro*: atividade antioxidante potencial – métodos químicos ORAC e HORAC descritos por Serra *et al.*¹¹; capacidade antioxidante celular (CAC) do extrato de frutos de *Rubus idaeus* L. avaliada em células da linhagem Caco-2 (Serra *et al.*¹¹). O *stress* oxidativo celular foi induzido por um agente químico, o AAPH, originando radicais peróxido; avaliação da capacidade dos compostos fenólicos do extrato para inibirem ativamente a resposta do *oxidative burst* realizada em neutrófilos humanos por quimioluminescência, segundo o método descrito por Freitas *et al.*¹².

Avaliação da atividade biológica do extrato de framboesa *in vivo* em

modelos animais: (i) atividade anti-inflamatória aguda – modelo do edema da pata da λ -carragenina (34 ratos Wistar; 6 grupos – controlos negativo e positivo, framboesa administrada via oral (p.o.) e framboesa administrada via intraperitoneal (i.p.) na dose de 15 mg de fenóis totais (EAG)/Kg peso corporal, trolox e indometacina). O volume da pata posterior esquerda dos ratos foi medido através método do volume deslocado num pletismómetro; (ii) atividade anti-inflamatória crónica - modelo experimental de artrite reumatoide atividade anti-inflamatória crónica - um modelo experimental de artrite reumatóide (AR) induzida pelo colagénio no rato – (20 ratos Wistar, 4 grupos, controlos negativo e positivo, extrato de framboesa p.o., extrato de framboesa i.p., dose de extrato – 15 mg de fenóis totais (EAG)/Kg peso corporal/dia, protocolo - dias 1 e 21 indução de AR com 2 injeção de colagénio tipo II bovino (CII), injetando nos ratos adjuvante completo de Freund, dias 23-34 tratamento com extrato, dia 35- avaliação das patas, colheita de sangue e sacrifício). As patas foram removidas, radiografadas e conservadas em formalina para posterior exame histológico incluindo a análise histoquímica da atividade das enzimas iNOS e COX-2. Nos soros fez-se a determinação de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase (CK) ureia e creatinina foram avaliados por métodos enzimáticos colorimétricos num autoanalisador COBAS; e dos teores das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 foi realizada por métodos imunoenzimáticos ELISA (*Kits* Quantikine HS Elisa para soro de rato, R&D Systems). Tratamento estatístico – análise ANOVA, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$).

Estudo nutricional de intervenção em voluntários saudáveis: (n=12, 75% dos indivíduos recrutados; 8 mulheres e 4 homens), previamente aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (05/06/2012). Todos os participantes preencheram um questionário médico e assinaram o consentimento informado. O estudo compreendeu as seguintes etapas: **ensaio 1**, antes da intervenção – (i) colheita de amostras de sangue em jejum > (ii) ingestão da refeição rica em gordura e açúcar (RRAG) [pequeno-almoço (1308 kcal; 38% gordura e 44% de açúcar – 1 iogurte grego (125 g) + 1 leite achocolatado UHT (200 mL) + 1 croissant folhado (140 g) com manteiga (10 g), 2 fatias de queijo (40g) e fiambre (20g)] > (iii) colheita de sangue 1h, 2h, 4h e 6h após a ingestão da refeição; **intervenção nutricional** – suplementação da dieta dos participantes com uma ingestão diária de 150 g de framboesas; **ensaio 2**, após da intervenção – repetição das etapas (i), (ii) e (iii) realizadas no ensaio 1. Os teores em glucose, triglicéridos, colesterol total, LDL e HDL foram avaliados por métodos enzimáticos colorimétricos num autoanalisador COBAS, a quantificação da LDL oxidada (oxLDL) e dos teores das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 foi realizada por métodos imunoenzimático ELISA (*kit* Mercodia Oxidized LDL Elisa e *Kits* Quantikine HS Elisa, R&D Systems, respetivamente). Todos os resultados foram tratados estatisticamente pelo método ANOVA de medidas repetidas. As diferenças entre tratamentos para as diferentes variáveis foram realizadas com o teste t-Student para amostras emparelhadas. Em ambos os casos considerou-se haver diferenças

significativas para valores de $p < 0.05$.

Alegações de saúde sobre framboesas: pesquisa dos sítios eletrónicos da EUR-Lex, EFSA, DGAV e do 'EU Register of Nutrition and Health Claims'.

A descrição detalhada dos diferentes métodos pode ser consultada em Correia⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O quadro 1 apresenta um resumo da caracterização química das amostras de *Rubus idaeus* L. analisadas. Em termos globais, o teor em ácido ascórbico e a composição fenólica, qualitativa (predominância de antocianinas e elagitaninos) e quantitativa, encontrava-se dentro da gama de valores dos dados publicados na bibliografia para este pequeno fruto⁷. Os estudos realizados permitiram escolher as melhores condições de preparação dos extratos de framboesa, utilizando uma solução extratante constituída por metanol:água:ácido fórmico (79,9:20:0,1 v/v/v). No estudo da caracterização das amostras das variedades de *Rubus idaeus* L. (Himbo-top, Amira, Erika e Polka), ao longo de um ciclo produtivo e de três anos consecutivos não se verificaram alterações significativas na sua composição fenólica em termos quantitativos mas observaram-se diferenças nos compostos individuais. As amostras usadas nos ensaios *in vitro* e animais e as do EINH apresentavam uma atividade antioxidante *in vitro* avaliada pelos métodos ORAC e HORAC⁷. O extrato de *Rubus idaeus* L. selecionado mostrou igualmente atividade antioxidante elevada em ensaios que avaliam o mesmo efeito em meio celular como o CAC em células Caco-2 (78 μmol equivalentes de quercetina (EQ)/100g de framboesa) e na modulação do *oxidative burst* dos neutrófilos (figura 1). O elevado teor destes frutos em vitamina C e em compostos fenólicos terá igualmente contribuído para a elevada atividade antioxidante observada⁷. Os dados dos estudos biológicos *in vivo* realizados em modelos experimentais encontram-se nas figuras 1 a 8. O extrato administrado [15 mg Fenóis Totais (EAG).Kg⁻¹] quando usado no modelo de inflamação aguda de edema induzido pela carragenina, em rato, mostrou ter um elevado efeito anti-inflamatório mas só quando foi administrado via i.p. (figura 2). No modelo de inflamação crónica de AR induzida pelo colagénio II, o mesmo extrato administrado i.p. mas também por via oral (p.o.) mostrou ter uma potente atividade anti-inflamatória diminuindo o edema, os danos na cartilagem, o inchaço dos tecidos moles e a reabsorção óssea e reduzindo marcadamente a expressão de iNOS e de COX-2, demonstrando uma proteção significativa na progressão da AR (figuras 3 a 8). No ENIH, pretendeu-se estudar o efeito do consumo de 150 g de framboesas, diariamente, durante 3 semanas, no stresse pós-prandial metabólico, oxidativo e inflamatório, induzido por uma refeição hipercalórica rica em gordura e açúcar (RRGA), em voluntários saudáveis. Os resultados mostraram que o consumo de framboesas evitou o decréscimo pronunciado dos níveis de HDL (figura 10), diminuiu significativamente os valores basais de LDLox dos voluntários (figura 11) e atenuou o aumento de valor de TNF- α e de IL-6 provocados pela ingestão

da mesma refeição (figuras 12 e 13). Os resultados das citocinas estão concordantes com o estudo de Gregersen *et al.*¹³, em que tanto uma refeição rica em gordura como outra rica em açúcar foram responsáveis pelo incremento dos valores pós-prandiais de IL-6 e são semelhantes aos encontrados em outros estudos que usaram igualmente alimentos ricos em compostos fenólicos^{14,15}. Os nossos resultados sugerem que a framboesa e o seu extrato fenólico podem atenuar, em certa medida, o stresse metabólico, oxidativo e inflamatório e, como tal, ter um papel importante de proteção na saúde humana. Na UE, o uso de alegações de saúde realizadas em rótulos, na publicidade ou na promoção de alimentos, incluindo suplementos alimentares, carece da autorização prévia da Comissão Europeia e Estados-Membros, salvaguardando-se o cumprimento dos requisitos legais estabelecidos⁷. Um pedido de autorização de uma alegação de saúde deve referir-se à relação entre um alimento e um único efeito alegado e constitui um processo independente que reúne todas as informações e dados científicos apresentados visando a autorização da alegação de saúde proposta¹⁶. Os resultados obtidos, ainda que insuficientes para fundamentar uma alegação de saúde para a framboesa, constituem um alicerce capaz de possibilitar a prossecução dos trabalhos visando esse objetivo.

CONCLUSÕES

A caracterização química e a avaliação da atividade biológica de frutos e de extratos de frutos de *Rubus idaeus* L. nacionais realizados neste trabalho pode possibilitar um contributo efetivo para o desenvolvimento de uma alegação de saúde para a framboesa. Os estudos realizados indicaram/sugerem que: ⁽¹⁾as metodologias cromatográficas usadas na caracterização fenólica dos extratos de frutos de *Rubus idaeus* L. das cultivares em estudo mostraram-se adequadas para o fim visado; ⁽²⁾o extrato de framboesa e a framboesa estudada apresentam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. A identificação e caracterização da mistura fenólica-alvo, a prossecução de estudos para o desenvolvimento de uma alegação de saúde relativa à saúde das articulações para um extrato de framboesa e o estabelecimento de um efeito fisiológico benéfico específico para o fruto são perspetivas a explorar em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

WHO/FAO. Report of a WHO/FAO Expert Consultation. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. *WHO Technical Report Series*. 2003(TRS 916):1-160.

Calder PC, Albers R, Antoine J-M, et al. Inflammatory disease process and interactions with nutrition. *British J. Nutr.* 2009;101:S1-S45.

WHO. Global Status Report on noncommunicable diseases. *WHO Press*. 2014:1-298.

Rao AV, Snyder DM. Raspberries and Human Health: A Review. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58:3871–3883.

Mullen W, Stewart A, Lean M, Gardner P, Duthie G, Crozier A. Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J Agric Food Chem.* Aug 2002;50(18):5197-5201.

Borges G, Degeneve A, Mullen W, Crozier A. Identification of Flavonoid and Phenolic Antioxidants in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currants, and Cranberries. *J Agric Food Chem.* Dec 2010;58:3905-3909.

Correia, M. Caracterização química e avaliação da atividade biológica da framboesa (*Rubus idaeus* L.). Contribuição para o desenvolvimento de uma alegação de saúde. Lisboa. Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, 2016.

EFSA/NDA. General guidance for stakeholders on the evaluation of Article 13.1, 13.5 and 14 health claims. *EFSA Journal.* 2011;9(4)(2135):(acessível em Figueira ME, Câmara MB, Direito R, et al. Chemical characterization of a red raspberry fruit extract and evaluation of its pharmacological effects in experimental models of acute inflammation and collagen-induced arthritis. *Food Funct.* Dec 2014;5(12):3241-3251.

González-Barrio R, Borges G, Mullen W, Crozier A. Bioavailability of Anthocyanins and Ellagitannins Following Consumption of Raspberries by Healthy Humans and Subjects with an Ileostomy. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58:3933-3939.

Serra AT, Matias AA, Frade RF, et al. Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2- Antioxidant and antiproliferative activities. *J Functional Food* 2010; 2:46-53.

Freitas M, a GP, G., b JLFCLa, Eduarda Fernandes. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clinical Biochemistry.* 2008(41):570–575.

Gregersen S, Samocha-Bonet D, Heilbronn L, Campbell L. Inflammatory and oxidative stress responses to high-carbohydrate and high-fat meals in healthy humans. *J Nutr Metab.* . 2012:2012:238056.

Zhu Y, Ling W, Guo H, et al. Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23(9):843-849.

Jeong H, Hong S, Lee T, et al. Effects of black raspberry on lipid profiles and vascular endothelial function in patients with metabolic syndrome. *Phytother Res.* . 2014;28(10):1492-1498.

Comissão. Regulamento (CE) n° 353/2008 da Comissão, de 18 de Abril de 2008 , que estabelece normas de execução relativas aos pedidos de autorização de alegações de saúde, como previsto no artigo 15.º do Regulamento (CE) n° 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho. *JO L109 de.* 2008; 19.4.2008:11-16.

QUADROS E FIGURAS

Parâmetro	Média ao longo De 1 Outono De Produção 4 cv. (min – máx)	Média de 3 Outonos de produção 4 cv. (min – máx)	Média de 3 Outonos de produção (Amira)	Testes <i>in vitro</i> e animais	EINH (Amira)
Ácido ascórbico (mg) ¹	–	–	–	16,8 ± 1,60	22,3 ± 1,50

FT (mg EAG) ¹	262,9 - 300,0	235,2 - 284,3	262,9 ± 50,69	171,0 ± 4,17	226,4 ± 6,87
FLT (mg EC) ¹	29,6 - 37,2	49,7 - 58,3	53,5 ± 6,95	24,5 ± 1,44	46,6 ± 2,06
AT (mg EC3G) ¹	—	44,1 - 60,3	53,8 ± 52,37	20,0 ± 2,76	51,6 ± 1,18
THT (mg EAT) ¹	365,1 - 439,3	347,1 - 377,3	374,2 ± 216,93	166,1 ± 0,19	367,4 ± 3,06
TCT (mg EC) ¹	—	20,7 - 20,9	20,8 ± 0,29	17,7 ± 0,25	20,9 ± 0,04
FT (mg EAG) ²	115,7 - 170,2	125,7 - 142,7	125,7 ± 29,63	—	120,2 ± 25,36
Ácido Gálico (mg AG) ²	<0,1 ^(LD)	<0,1 ^(LD)	<0,1 ^(LD)	2,40 ± 0,10	2,40 ± 0,10
AT (mg EC3G) ²	46,3 - 81,6	73,4 - 89,4	83,9 ± 55,42	23,44 ± 0,85	85,1 ± 16,63
Cianidina-3-soforósido	26,7 - 62,9	38,6 - 89,4	55,2 ± 35,05	18,89 ± 0,60	55,0 ± 8,92
Cianidina-3-glucosilrutinosido	<1,5 ^(LQ) - 19,4	<1,5 ^(LQ) - 16,5	<1,5 ^(LQ) - 4,7	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)
Cianidina-3-glucósido	7,9 - 18,8	11,4 - 24,6	21,9 ± 18,13	2,44 ± 0,05	27,4 ± 6,52
Pelargonidina-3-glucosilrutinosido	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	0,06 ± 0,01	<0,4 ^(LD)
Pelargonidina-3-soforósido	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	1,04 ± 0,10	<0,4 ^(LD)
Cianidina-3-rutinosido	<0,4 ^(LD) - 4,7	<0,4 ^(LD) - 11,6	<0,4 ^(LD)	0,85 ± 0,08	2,7 ± 1,19
Pelargonidina-3-rutinosido	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	0,12 ± 0,006	<0,4 ^(LD)
Pelargonidina-3-glucósido	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	<0,4 ^(LD)	0,04 ± 0,008	<0,4 ^(LD)
Sanguiina H6 (mg EAG) ²	—	26,4 - 38,7	31,0 ± 8,41	—	29,6 ± 7,87
ET (mg EAG) ²	34,9 - 42,8	26,8 - 72,6	49,7 ± 24,6	—	29,6 ± 7,87
AET (mg EAE) ²	—	1,65 - 2,62	1,56 ± 0,99	1,80 ± 0,01	1,90 ± 0,88

Quadro 1 – Resumo dos dados do teor em ácido ascórbico e da caracterização fenólica de extratos de *Rubus idaeus* L. (por 100 g /framboesa)

AET – somatório do teor em ácido elágico e derivados; AT – antocianinas totais; DP – Desvio- padrão; EAG – equivalentes de ácido gálico; EC – equivalentes de (+) – catequina; EC3G – equivalentes de cianidina-3-glucósido; EAT – equivalentes de ácido tânico; ET – elagitaninos totais; FT – fenóis totais; FLT – flavonóides totais; LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação;

¹ método espectrofotométrico; ² método de HPLC

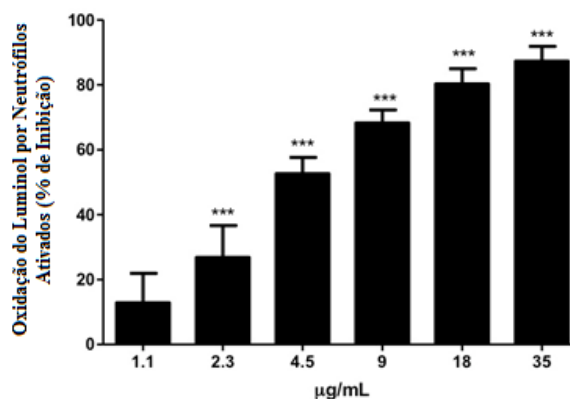


Figura 2 - Efeito inibitório de um extrato de *Rubus idaeus* L. no *oxidative burst* em neutrófilos humanos. *** p<0,001 quando comparado com o ensaio controle. Os valores são apresentados como média ±DP

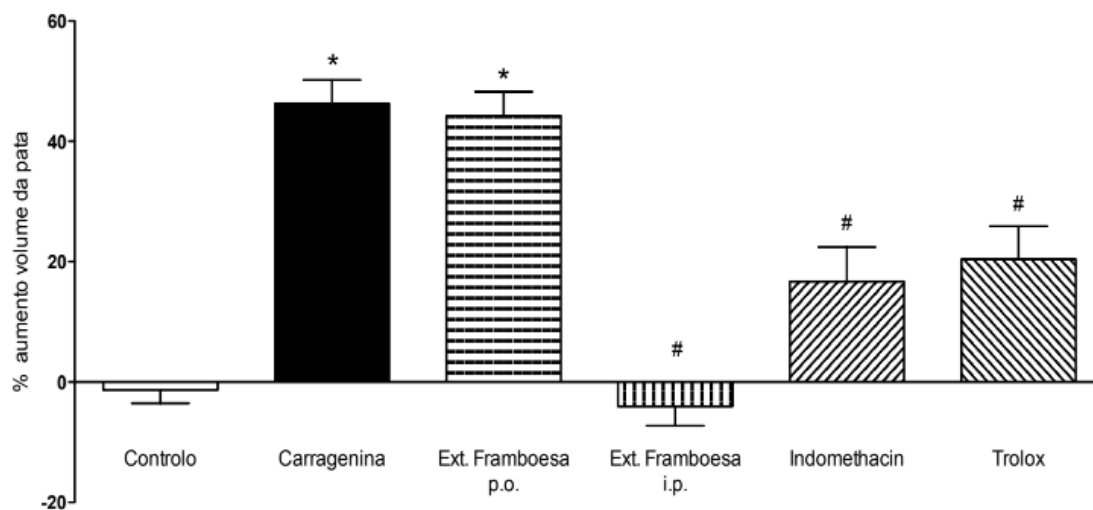


Figura 3 – Efeitos do extrato de framboesa vermelha (i.p. e p.o.) no aumento do volume da pata induzido pela carragenina. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). * $P < 0,001$ vs. grupo de controlo ; # $P < 0,001$ vs. grupo carragenina.

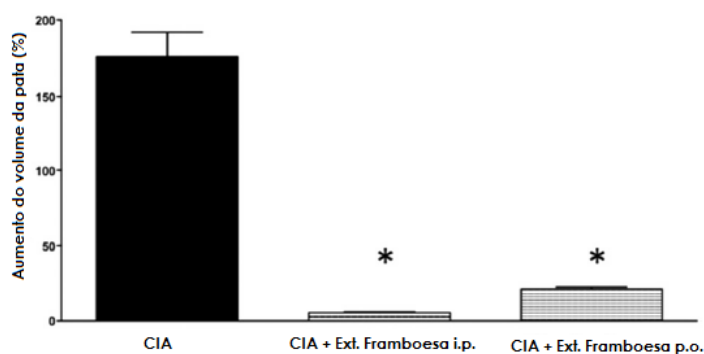


Figura 4 - Efeitos do extrato de frutos de framboesa vermelha (i.p. e p.o.) no aumento do volume da pata associado à CIA.

CIA – Artrite induzida pelo colagénio; Os resultados são apresentados como média \pm EPM. * $P < 0,001$ vs. Grupo CIA.

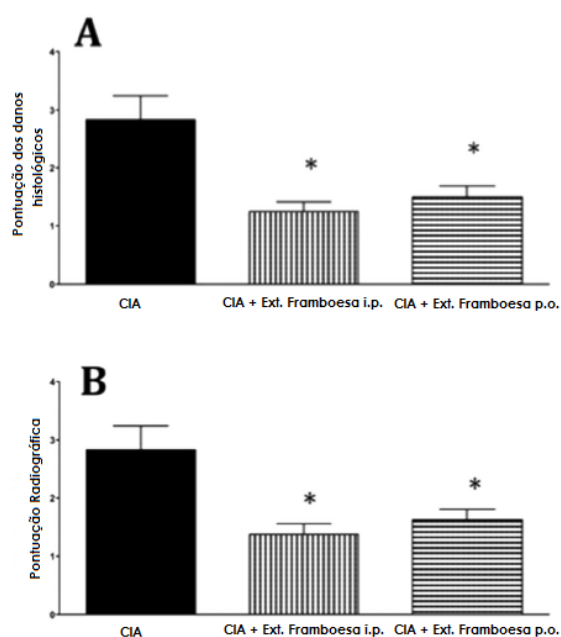


Figura 5 - Efeito do tratamento com extrato de framboesa (i.p. e p.o.) na pontuação dos danos histológicos (A) e na pontuação radiológica (B) em animais com artrite induzida pelo colagénio (CIA).

Os valores apresentados são a média e o erro padrão da média. * $p < 0,001$ vs. tratados com veículo (CIA).

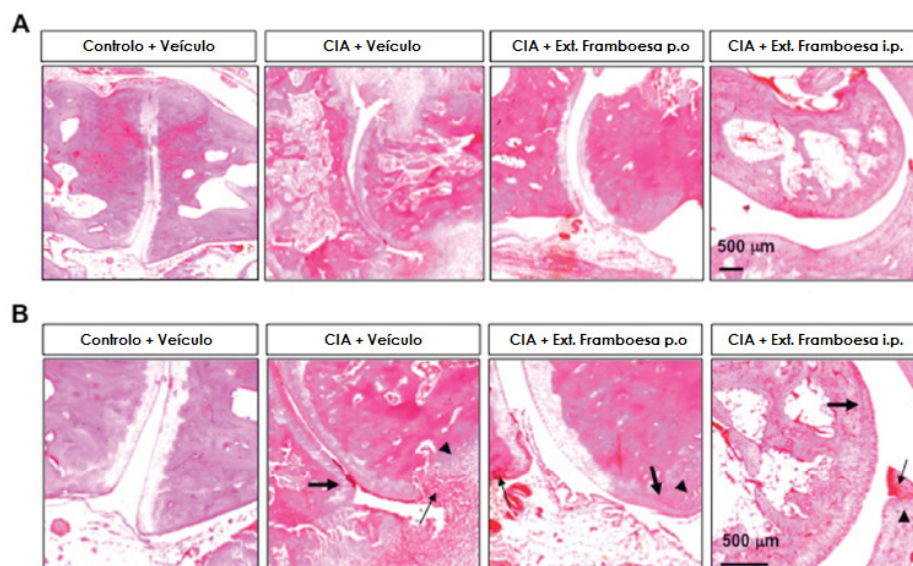


Figura 6 - Cortes histopatológicos (A) e ampliações dos mesmos (B) relativos aos efeitos do extrato de framboesa vermelha num modelo animal de CIA, em ratos.

Os cortes histopatológicos de um rato controle negativo, apresentam uma membrana sinovial normal, cartilagem não danificada, não evidenciando *pannus* ou reabsorção óssea na zona marginal. Os cortes histopatológicos de ratos controle positivo em que a artrite foi induzida pelo colagénio (CIA), evidenciavam danos na cartilagem (seta grande), infiltração acentuada, *pannus* (seta pequena) e reabsorção óssea (cabeça da seta). Finalmente, os cortes histopatológicos de amostras provenientes de animais CIA, tratados com o extrato (*i.p.* ou *p.o.*), exibem uma sinóvia normal, cartilagem com pequenos danos (seta grande), apresentando uma redução de *pannus* (seta pequena) ou de reabsorção óssea (cabeça de seta) na zona marginal. Ampliação = X100 original

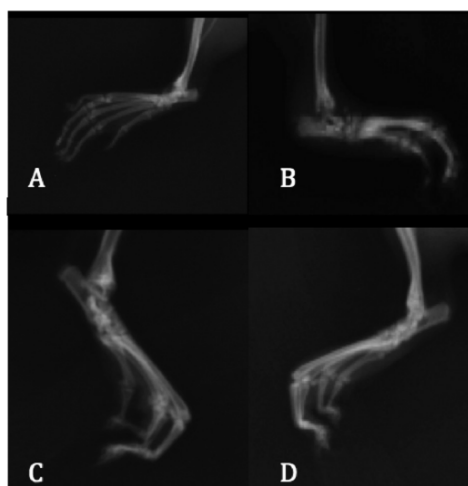


Figura 7 - Progressão radiográfica da CIA nas articulações tibiotársicas. (A) não existem evidências de alterações patológicas das articulações tibiotársicas de animais de controle (normais). (B) As patas traseiras de ratos com CIA, no dia 35, demonstraram a reabsorção óssea e erosão conjunto bastante significativo. O tratamento com o extrato de framboesa fruta vermelha (15mg.kg^{-1}), administrado tanto por p.o. (C) como por i.p. (D) suprimiu significativamente a patologia articular e o edema de partes moles na pata posterior. As imagens de raios - X são representativas de pelo menos três experiências realizadas em dias experimentais diferentes.

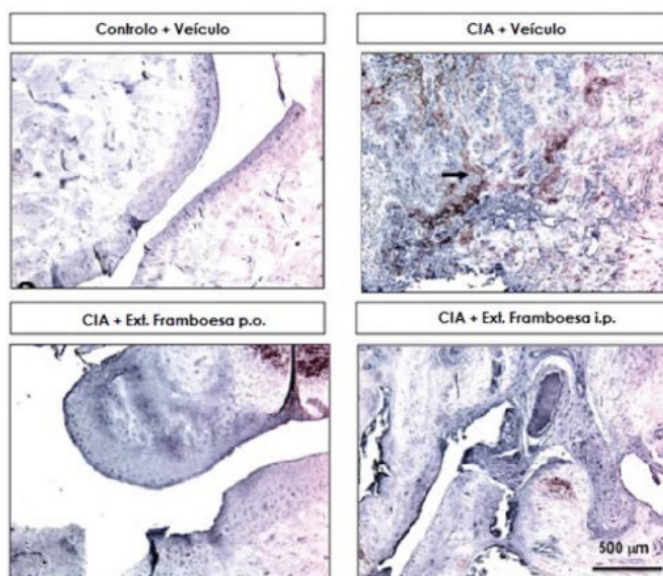


Figura 8 - Redução da ativação COX-2 no modelo CIA resultado da administração do extrato de framboesa vermelha.

Os ratos foram tratados com o extrato (15 mg kg^{-1} , i.p. ou p.o., $n = 5$ por grupo) e as amostras imunocoradas para COX-2. Espécimes de um rato não tratado quase não exibem nenhuma expressão de COX-2, enquanto ratos artríticos tratados com veículo apresentaram uma produção maciça de COX-2, nomeadamente perto dos infiltrados (coloração castanha – seta grande). Os espécimes provenientes de animais tratados com o extrato de framboesa vermelha (15 mg.kg^{-1}), administrado por ambas as vias, oral e i.p., evidenciavam infiltração reduzida e coloração COX-2 (ampliação original x 100). A barra de escala é igual a $500 \mu\text{m}$.

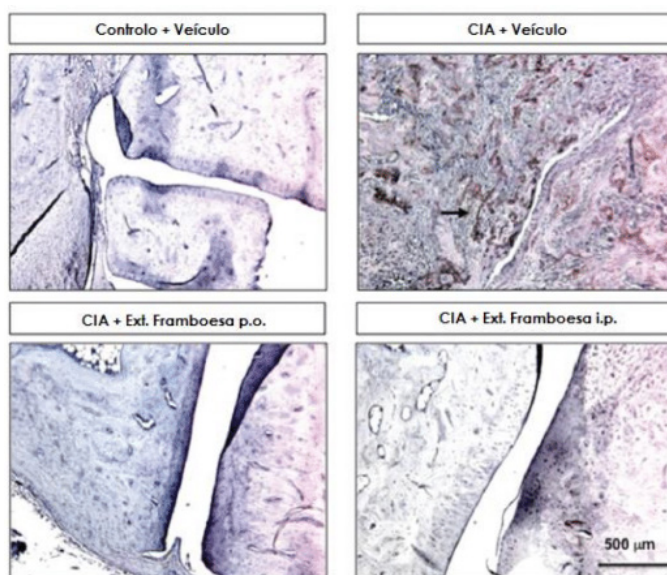


Figura 9 - Redução da ativação iNOS no modelo CIA resultado da administração do extrato de framboesa vermelha.

Os ratos foram tratados com o extrato (15 mg kg^{-1} , i.p. ou p.o., $n = 5$ por grupo) e as amostras imunocoradas para iNOS. Espécimes de um rato não tratado quase não exibem nenhuma expressão de iNOS, enquanto ratos artríticos tratados com veículo apresentaram uma produção maciça de iNOS, nomeadamente perto dos infiltrados (coloração castanha – seta grande). Os espécimes provenientes de animais tratados com o extrato de framboesa vermelha (15 mg.kg^{-1}), administrado tanto por via oral como por ip, evidenciavam infiltração reduzida e coloração iNOS (ampliação original x 100). A barra de escala é igual a $500 \mu\text{m}$.

Figura 10 - ENIH: HDL-C (mg/dL)

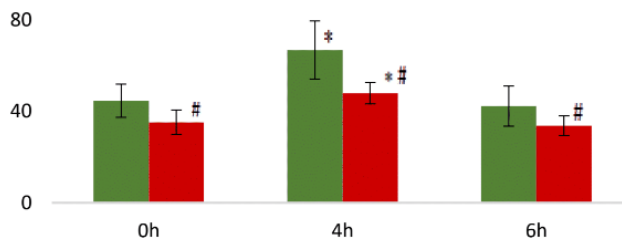
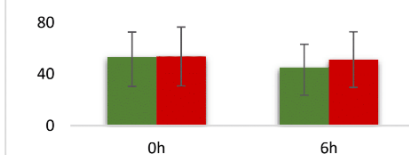


Figura 11 - ENIH: oxLDL (mg/dL)

Antes da Intervenção ■ Depois da intervenção ■

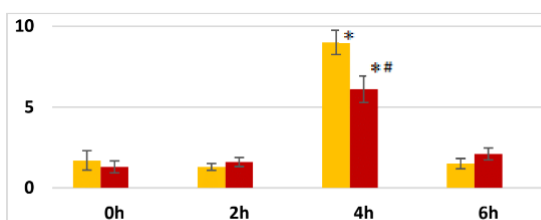
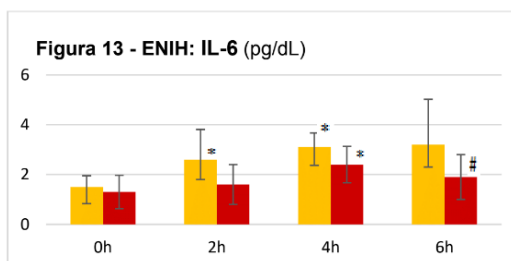


Figura 12 - ENIH: TNF-α (mg/mL)



Antes da Intervenção ■ Depois da intervenção ■

HDL-C (Figura 10), **oxLDL** (Figura 11), **TNF-α** (Figura 12) e **IL-6** (Figura 13) níveis medidos em jejum (0h) e em tempos diferentes após a ingestão da RRA, antes e depois da intervenção nutricional em voluntários adultos saudáveis

* $p < 0,05$ vs. o valor basal no mesmo ensaio e [#] $p < 0,05$ vs. o valor no mesmo tempo no ensaio antes da intervenção; Os resultados foram expressos como Média \pm DP; n=12.